

51

Int. Cl. 2:

A 61 K 37/14

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DT 26 16 086 A 1

11

## Offenlegungsschrift 26 16 086

20

Aktenzeichen: P 26 16 086.1

21

Anmeldetag: 13. 4. 76

22

Offenlegungstag: 3. 11. 77

23

30

Unionspriorität:

32 33 34

50

Bezeichnung:

Kolloidales Volumenersatzmittel aus Hydroxyäthylstärke und  
Hämoglobin

70

Anmelder:

Dr. Eduard Fresenius, Chemischpharmazeutische Industrie KG,  
6380 Bad Homburg

72

Erfinder:

Beez, Michael, Dr.; Rothe, Wolfgang, Dr.; 6380 Bad Homburg

55

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:  
DT-OS 24 49 885

DT 26 16 086 A 1

2616086

Patentansprüche:

1. Kolloidales Volumenersatzmittel aus Hydroxyäthylstärke und Hämoglobin, dadurch gekennzeichnet, daß Hydroxyäthylstärke mit Hämoglobin stromafrei gekoppelt ist.
2. Volumenersatzmittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyäthylstärke einen Anteil von mindestens 90 % Amylopectin-Hydrolysat aufweist.
3. Volumenersatzmittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyäthylstärke eine Eigenviskosität von 0,05 - 0,30 dl/g bei 25°C aufweist.
4. Volumenersatzmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyäthylstärke einen Äthersubstitutionsgrad bis zu 0,90 Hydroxyäthylgruppen pro Stärkemolekül aufweist.
5. Volumenersatzmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyäthylstärke ein Molekulargewicht  $M_w$  von 50.000 bis 700.000 und ein teilchengemitteltes Molekulargewicht  $M_n$  von 20.000 bis 100.000 aufweist.
6. Volumenersatzmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Äthylenglykolanteil

709844/0064

ORIGINAL INSPECTED

2616086

der Hydroxyäthylstärke weniger als 0,5 Gewichtsteile Athylenglykol auf 100 Teile modifizierte Stärke beträgt.

7. Volumenersatzmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Hämoglobin aus frischem Humanblut frei von Antigenen, Zellbestandteilen und Pyrogenen hergestellt ist.
8. Verfahren zur Herstellung eines Volumenersatzmittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxyäthylstärke mit Hilfe eines Vernetzungsreagenzes mit Hämoglobin stromafrei gekoppelt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Vernetzungsreagenz Bromcyan, Diisocyanat, ein Succinimidderivat, Halogenessigsäurederivat, Carbonsäureacid oder dergleichen ist.
10. Verfahren zur Herstellung einer Infusionslösung auf der Basis eines Volumenersatzmittels nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Hydroxyäthyl-Hämoglobin-Vernetzungsprodukte in Lösung gebracht werden, wobei die Lösung steril isotonisch und isoonkotisch ist.

709844/0064

2616086

Dr. Eduard Fresenius  
Chemisch-pharmazeutische Industrie KG  
6380 Bad Homburg v.d.H. 1

---

Kolloidales Volumenersatzmittel aus  
Hydroxyäthylstärke und Hämoglobin

Die Erfindung bezieht sich auf kolloidale Volumenersatz-  
mittel aus Hydroxyäthylstärke und Hämoglobin und deren Her-  
stellungsverfahren.

Blut- und Plasmaverluste bis zu ca. 1,5 Liter nach Ver-  
letzungen, Operationen und internen Erkrankungen lassen  
sich heutzutage durch Infusion kolloidaler Volumenersatz-  
mittel (z.B. Gelatine, Dextrane, Hydroxyäthylstärke) aus-  
gleichen. Diese Kolloide tierischen bzw. pflanzlichen Ur-  
sprungs dienen dabei der Aufrechterhaltung eines kolloid-  
osmotischen (onkotischen) Druckes und einer physiologischen  
Wasserbindung, welche im Blut im wesentlichen durch Human-  
albumin geregelt werden.

709844/0064

- 7 -

4

2616086

Übersteigt der Blut- oder Plasmaverlust 1500 ml, so reicht die verbleibende Erythrocytenzahl für einen adäquaten Sauerstofftransport nicht aus, so daß Zellen, Gewebe und Organe nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. In solchen Fällen mußte Vollblut übertragen werden, ein Vorgehen, welches trotz sorgfältiger Spenderauswahl mit Risiken behaftet ist. Insbesondere treten folgende Nachteile auf:

- a) Gruppengleiches Blut, insbesondere seltene Gruppen, wie Rh negativ, AB oder B, kann nicht unbegrenzt bereitgestellt werden.
- b) Mit jedem Blutpräparat (Vollblut ebenso wie Blutbestandteile) werden körperfremde Substanzen zugeführt, die eine Immunisierung bewirken und eine spätere lebensrettende Bluttransfusion durch anaphylaktische Zwischenfälle gefährden können.
- c) Nach Vollbluttransfusionen unter Anwendung anderer Blutpräparate kann es zu einer Hepatitis kommen, welche oft zu einer lebenslangen Belastung des Patienten führt.
- d) Blutplättchen und weiße Blutkörperchen sind nur wenige Tage lebensfähig und eine Aggregatbildung zugrunde gegangener Zellen erfordert die Anwendung von Mikrofiltern bei Bluttransfusionen, um Verstopfungen im Mikrokapillarenbereich von Lunge, Gehirn und Herz zu vermeiden.

709844/0064

2616086

- e) Vollblut und Blutbestandteile sind wegen der erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen und der kurzen Verwendbarkeit relativ kostspielig.

Zu den Präparaten, welche im Hinblick auf eine O<sub>2</sub>-tragende Funktion im tierischen Organismus seit Jahren getestet werden, gehören die Fluorkohlenwasserstoff-Emulsionen und stromafreie Hämoglobinlösungen.

Der klinische Einsatz vollsynthetischer Fluorcarbon-Emulsionen (Clark und Geyer, Triangel, 11, 4, 115 (1973) ist bisher nicht möglich. Emulsionsstabilität und quantitative Ausscheidung der körperfremden Fluorkohlenwasserstoffe und der Emulgatoren sind ungelöste Probleme.

Auch der klinische Einsatz zellfreier Hämoglobinlösungen, welche von Rabiner (J. Exp. Med. 126, 1127 (1967) vorgeschlagen und von zahlreichen Forschern in Europa weiterentwickelt wurden, konnte bisher nicht realisiert werden, da diese Präparate nierentoxische Wirkung, Extravasationen und Gerinnungsstörungen zeigten.

Selbst die quantitative Beseitigung sämtlicher Zellfragen durch Relihan (Ann. Surg. 176, 700 (1972) als nachgewiesene Ursache nephrotoxischer Wirkungen von stromafreien Hämoglobinlösungen verhalf der Hämoglobinlösung nicht zur klinischen Anwendung, da die Verweildauer im Kreislauf für eine adäquate Volumenwirkung zu kurz ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein kolloidales Volumenersatzmittel mit sauerstofftragender Wirkung zu

709844/0064

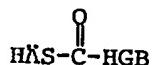
- X -

6

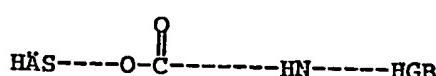
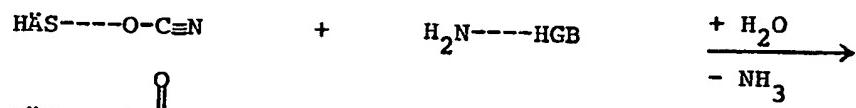
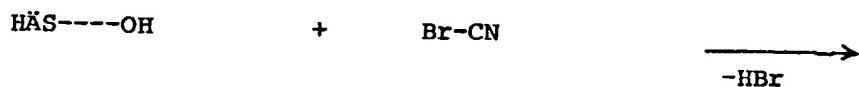
2616086

schaffen. Die Volumenwirkung soll dabei nach Ausmaß und Dauer vorwählbar sein, und die  $O_2$ -tragende Wirkung soll die Wirkung einer Vollbluttransfusion haben.

Die Lösung der gestellten Aufgabe durch die Erfindung besteht darin, daß das bewährte kolloidale Volumenersatzmittel Hydroxyäthylstärke mit Hämoglobin stroma-frei über chemische Vernetzungsverbindungen gekoppelt wird, wie im folgenden an einem Beispiel demonstriert wird:



bzw. chemisch formuliert:

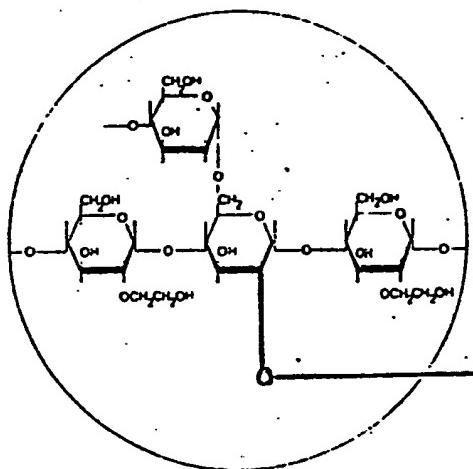


709844/0064

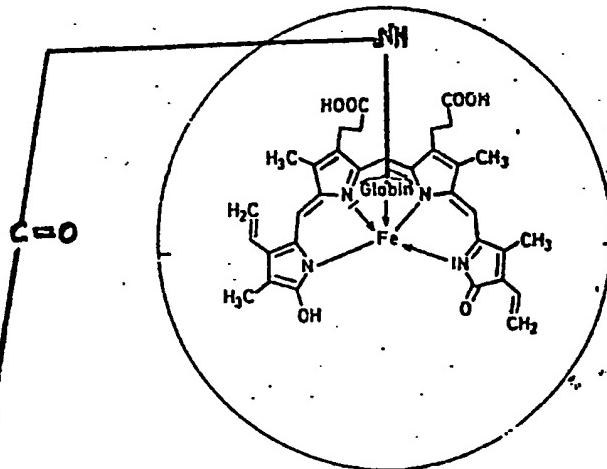
2616086

Vernetzungs -- Produkte

H A S  
Hydroxyäthylstärke



H G B  
Hämoglobin



Ganz entsprechend lassen sich auch andere Vernetzungsreagenzien einsetzen, wie z.B. Diisocyanat, Succinimidederivate, Halogenessigsäurederivate, Carbonsäureazide und andere Vernetzungsreagenzien.

Die Hydroxyäthylstärke weist vorteilhaft einen Anteil von mindestens 90 % Amylopectin-Hydrolysat, eine Eigenviskosität von 0,05 - 0,30 dl/g bei 25°C, einen Äthersubstitutionsgrad von 0,00 bis 0,90 Hydroxyäthylgruppen pro Stärkemolekül, ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht  $M_w$  von 50.000 bis 700.000, ein teilchengemitteltes Molekulargewicht  $M_n$  von 20.000 bis 100.000 und einen Äthylenglykolanteil von weniger als 0,5 Gewichtsteilen Äthylenglykol auf 100 Teile modifizierte Stärke auf.

Das stromafreie Hämoglobin wird vorteilhaft aus frischem Humanblut frei von Antigenen, Zellbestandteilen und Pyro-

709844/0064

- 8 -

2616086

genen lyophilisiert hergestellt.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß die kurze Kreislaufverweildauer des Hämoglobins durch Verknüpfung mit HÄS gezielt verlängert wird. Sie läßt sich durch die Art der Vernetzung, Vernetzungsgrad und durch Molekulargewichtsverteilung und Substitutionsgrad der gewählten Hydroxyäthylstärke variieren. Somit ergibt sich die Möglichkeit, HÄS/HGB-Präparate mit unterschiedlicher Volumenwirkung nach Ausmaß und Dauer herzustellen, also z.B. ein Präparat mit 6 h mittlerer Volumenverweildauer (d.h. 50 % des infundierten Volumens sind nach 6 h noch im Kreislauf nachweisbar) oder ein anderes Präparat mit 2 h mittlerer Verweildauer (d.h. 50 % des infundierten Volumens sind nach 2 h noch im Kreislauf nachweisbar). Weiterhin wird die Hydroxyäthylstärke durch die Bindung des Hämoglobins zum O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Träger.

Die Bindungsfestigkeit des Sauerstoffes läßt sich durch Vernetzungsart und Vernetzungsgrad variieren. Weitere Vorteile des erfindungsgemäßen Volumenersatzmittels bestehen darin, daß es keine Hepatitis oder andere Krankheiten überträgt, blutgruppenunabhängig einsetzbar, in großen Mengen definiert herstellbar, über einen langen Zeitraum lagerfähig und daher überall verfügbar und rasch einsetzbar ist. Zum anderen kann dieses Ersatzmittel mit niedriger Viskosität als mikrozirkulatorisch aktive Lösung für Durchblutungsstörungen gefertigt werden.

409844/0084

- 7 -

9

2616086

Die Herstellung und Verwendung des erfindungsgemäßen Volumenersatzmittels ist im nachstehenden durch ein Beispiel erläutert:

Herstellungsbeispiel:

Eine Lösung von 1 g Bromcyan in 10 ml Dioxan wird bei pH 9,0 in eine wässrige Lösung von 5 g HÄS unter Rühren und Eiskühlung zugestropft, wobei ein pH von 9,0 durch Autotitration mit NaOH 6 n aufrechterhalten wird. Nach einstündigem Rühren unter Eiskühlung wird durch Zugabe der 5fachen Menge Aceton das Hydroxyäthylstärke-Cyan-Derivat ausgefällt, zentrifugiert und mit Aceton und Eiswasser gewaschen. Anschließend wird es bei 4°C in Phosphatpuffer (pH 7,3) gelöst, 5 ml einer zellfreien Hämoglobinlösung (10 mg/ml) zugegeben und 24 h unter Lichtabschluß gerührt. Anschließend wird die Lösung durch ein 0,2 Mikronfilter sterilfiltriert und in sterilen lichtgeschützten Flaschen kühl gelagert.

Hydroxyäthylstärke/Hämoglobin-Vernetzungsprodukte dieser Art lassen sich durch entsprechende sterile Verdünnung auf isotonische und isoonkotische Verhältnisse bringen und können nach erfolgreicher chemischer, biologischer und Partikelkontrolle als kolloidale Volumenersatzmittel mit sauerstofftragender Wirkung eingesetzt werden.

Dies lässt sich im Tierexperiment stellvertretend demonstrieren, wie vereinfacht beschrieben wird:

709844/0064

- 8 -

10

2616086

Zwergschweine mit einem Körpergewicht unter 20 kg werden unter Narkose und konstanter Beatmung mit einem definierten Luft/O<sub>2</sub>-Gemisch in 10 min Abständen arteriell entblutet (10 ml/kg), gleichzeitig wird HÄS/HGB-Lösung mit vergleichbarem Hämoglobingehalt intravenös durch Druckinfusion zugeführt.

Die Aufrechterhaltung eines normalen Blutvolumens und physiologischer arterieller und zentralvenöser O<sub>2</sub>-Spannungen dienen als Beleg, daß Volumenwirkung und sauerstofftragende Wirkung entsprechend dem eingesetzten HÄS/HGB-Präparat bis zu einem Blutersatz von 50 % und darüber hinaus möglich ist.

Eine laufende Überwachung der hämodynamischen Parameter Herzzeitvolumen, Pulmonaldruck, linker Vorhofdruck, peripherer Widerstand und direkter Blutdruck sowie der Nierenausscheidung und Methämoglobin ermöglichen eine weitere Wirkungskontrolle der verschiedenen einsetzbaren HÄS/HGB-Präparate.

Hydroxyäthylstärke/Hämoglobin-Vernetzungsprodukte lassen sich für die verschiedenen Anwendungsbereiche von Blutersatzmitteln somit aus definierten Ausgangsprodukten und deshalb mit maßgeschneiderter Volumen/Oxygen-Wirkung herstellen.

Die O<sub>2</sub>-Transportkapazität lässt sich dabei durch die Wahl der Vernetzungsreagenzien und des Vernetzungsgrades variieren, da Hämoglobin in beliebigem Verhältnis mit HÄS ge-

709844/0064

- 8 -

11

2616086

koppelt werden kann. Die Kreislaufverweildauer und der Volumeneffekt ist vorherstimmbar durch die Wahl des jeweils eingesetzten HÄS-Präparates.

Als mögliche Einsatzbereiche kommen in Frage:

- a) Ersatz von Blut- und Plasmaverlusten, welche 1,5 Liter überschreiten (bei Unfällen, Operationen und Erkrankungen);
- b) Vorfüllung der Herz-Lungen-Maschine bei Herzoperationen,
- c) Cardiophlegische Lösung,
- d) Perfusion von Transplantaten,
- e) Rheologisch wirksame Lösungen mit hyperonkotischer Wirkung und geringer Viskosität.

Beim Ersatz größerer Blutverluste durch HÄS/HGB-Lösungen ist eine Überwachung und Korrektur des Gerinnungs- und Immunsystems durch Substitution geeigneter Fraktionen erforderlich.

709844/0064

